

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
7 novembre 2002 (07.11.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 02/088339 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 7/04

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/01482

(22) Date de dépôt international : 29 avril 2002 (29.04.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/05858 2 mai 2001 (02.05.2001) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147, rue de l'Uni-  
versité, F-75007 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : DELMAS,  
Bernard [FR/FR]; 14, rue Elie le Gallacs, F-92340 Bourg  
la Reine (FR). CHEVALIER, Christophe [FR/FR]; 38,  
rue de la Ferme, F-94400 Vitry sur Seine (FR).

(74) Mandataires : ORES, Béatrice etc.; Cabinet Ores, 6, av-  
enue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

**Publiée :**

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: BURSAL DISEASE VIRUS-LIKE PARTICLES

(54) Titre : PARTICULES PSEUDOVIRALES DE BIRNAVIRUS

(57) Abstract: The invention concerns chimeric particles obtained by fusion of the polyprotein of a bursal disease virus with a het-  
erologous polypeptide. The invention also concerns bursal disease virus-like particles resulting from the association of said chimeric  
proteins, and the use of said particles for obtaining vaccines.

(57) Abrégé : L'invention est relative à des protéines chimériques obtenues par fusion de la polyprotéine d'un birnavirus avec un  
polypeptide hétérologue. L'invention concerne également des particules pseudovirales de birnavirus résultant de l'association des-  
dites protéines chimériques, ainsi que l'utilisation desdites particules pour l'obtention de vaccins.

WO 02/088339 A2

17

### PARTICULES PSEUDOVIRALES DE BIRNAVIRUS

L'invention est relative à des particules pseudovirales de birnavirus et à leurs utilisations.

La famille des *Birnaviridae* regroupe 3 genres :

5 les aquabirnavirus, pathogènes des poissons, représentés par le virus de la nécrose infectieuse pancréatique (IPNV), les avibirnavirus, pathogènes des oiseaux, représentés par le virus de la bursite infectieuse (IBDV), et les entombirnavirus représentés par le virus X de la drosophile

10 (DXV).

Le virus IBDV est l'agent causal de la bursite infectieuse, également dénommée maladie de Gumboro, maladie contagieuse qui cause des dommages importants dans les élevages de volaille. Le virus qui infecte les lymphocytes B

15 dans la bourse de Fabricius, entraîne une immunosuppression qui favorise les atteintes infectieuses, notamment respiratoires et digestive.

Les birnavirus sont des virus à ARN double-brin, qui se présentent sous forme de particules icosaédriques non-

20 enveloppées de 60 nm de diamètre environ. Le génome des birnavirus est constitué de 2 segments, A et B. Le segment B code pour une protéine de 100 kDa, dénommée VP1, qui possède une activité ARN polymérase. Le segment A code pour une polyprotéine qui est clivée en trois protéines : pVP2

25 (également dénommée VPX), VP3 et VP4. La protéine VP2 est issue du clivage protéolytique de pVP2.

Dans le cas du virus IBDV, pVP2 correspond aux acides aminés 1 à 512 de la polyprotéine alors que la VP2 mature correspond aux acides aminés 1 à 441. VP4 correspond

30 aux acides aminés 513 à 755 et VP3 aux acides aminés 756 à 1012.

VP2 (38 kDa) et VP3 (33 kDa) sont les constituants majeurs de la capside virale. VP4 est la protéase virale responsable du clivage de la polyprotéine et

35 ne semble pas associée aux particules virales.

VP2 porte les épitopes inducteurs d'anticorps neutralisants alors que VP3 est associée à l'ARN génomique.

Les vaccins actuellement disponibles pour prévenir la bursite infectieuse sont dans la plupart des cas, constitués de virus vivants atténués. Ils possèdent toutefois les inconvénients classiques de ce type de vaccins, notamment le risque de mutations qui peut donner naissance à des virus plus virulents ou ayant perdu leur immunogénicité.

Des essais d'immunisation des poulets ont été effectués avec la protéine VP2 produite par génie génétique. Ils n'ont toutefois pas permis d'obtenir une protection satisfaisante, quel que soit le système d'expression utilisé (E. coli, levure, baculovirus).

Une alternative à l'utilisation de vaccins vivants atténués ou de vaccins à base de sous-unités virales consiste en l'utilisation de particules pseudovirales (également dénommées VLP pour « virus-like-particles », produites par autoassemblage des sous-unités constitutives de la capside virale. Ces particules imitent la structure et les propriétés antigéniques du virion natif, mais sont dépourvues d'acide nucléique et donc incapables de se répliquer. Il a ainsi été possible d'obtenir des particules pseudovirales pour certains virus, parmi lesquels on citera à titre d'exemple, les papillomavirus, le poliovirus, certains rétrovirus, le virus de l'hépatite B, les rotavirus, etc.

Des particules pseudovirales ont été utilisées non seulement en tant que vaccins, mais également comme vecteurs de molécules d'intérêt biologique, notamment de peptides ou d'acides nucléiques. On citera notamment des particules pseudovirales dérivées du virus HBV (KOLETZKI et al., Journal of General Virology, 78, 2049-2053, 1997), de papillomavirus (TOUZE et COURSAGET, Nucleic Acids Research., 26, 1317-1323, 1998), ou de rotavirus (Demande PCT/FR01/00676 au nom de l'INRA).

Cependant, dans le cas de certains virus, l'autoassemblage des protéines de capside n'intervient pas, ou produit une structure différente de celle de la particule virale native. C'est notamment le cas du virus IBDV. MARTINEZ-TORRECUADRADA et al. Virology, 278, 322-331, (2000) ont ainsi observé que l'expression de la polyprotéine pVP2-

VP4-VP3 de l'IBDV dans un système baculovirus ne génère pas efficacement de particules pseudovirales, mais aboutit principalement à la formation de structures tubulaires constituées de précurseur pVP2.

5 Les Inventeurs sont maintenant parvenus à obtenir des particules pseudovirales dérivées de birnavirus, et reproduisant la structure du virion natif.

Ils ont en effet constaté que, de façon  
surprenante, lorsque la polyprotéine du virus IBDV était  
10 fusionnée, à son extrémité C-terminale, à une séquence  
peptidique exogène, les protéines chimériques ainsi obtenues  
s'assemblaient entre elles pour reconstituer des particules  
pseudovirales possédant la morphologie et les propriétés  
antigéniques du virus IBDV natif.

15 La présente invention a pour objet une protéine  
chimérique comprenant la polyprotéine d'un birnavirus, liée à  
son extrémité C-terminale à un polypeptide X.

La présente invention a également pour objet :

- les séquences d'acide nucléique codant des  
20 protéines chimériques conformes à l'invention ;

- les cassettes d'expression, dans lesquelles une  
séquence d'acide nucléique codant une protéine chimérique  
conforme à l'invention est associée à des éléments appropriés  
de contrôle de la transcription, et éventuellement de la  
25 traduction ;

- les vecteurs recombinants comprenant au moins  
une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention ;

- les cellules-hôtes transformées par au moins  
une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention, et  
30 capables d'exprimer ladite séquence.

- les particules pseudovirales de birnavirus  
résultant de l'assemblage d'une ou plusieurs protéine(s)  
chimérique(s) conforme(s) à l'invention ;

- l'utilisation desdites particules pseudovirales  
35 pour la préparation de médicaments, notamment de vaccins, ou  
en tant que vecteurs de molécules d'intérêt thérapeutique,  
notamment de peptides ou d'acides nucléiques, vers des  
cellules cibles.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ledit birnavirus est le virus IBDV.

La taille du polypeptide X peut varier de quelques acides aminés à quelques centaines d'acides aminés.  
5 Avantageusement, elle est comprise entre 5 et 2000 acides aminés, de préférence entre 10 et 500 acides aminés.

Le polypeptide X peut être lié avec la polyprotéine de birnavirus directement ou bien par l'intermédiaire d'un lieu peptidique.

10 La nature du polypeptide X dépend de l'usage envisagé pour les particules pseudovirales résultant de l'autoassemblage de protéines de fusion conformes à l'invention.

Si ces particules pseudovirales sont uniquement  
15 destinées à l'obtention de vaccins contre les infections à birnavirus, la nature du polypeptide X est sans importance. Il peut s'agir d'un polypeptide de séquence quelconque.

Pour utiliser ces particules pseudovirales dans le cadre de vaccins divalents, destinés à protéger l'animal  
20 vacciné non seulement contre un burnavirus, mais également contre un autre pathogène, viral ou bactérien, le polypeptide X sera constituée par un antigène dudit pathogène.

A titres d'exemples non-limitatifs :

- pour obtenir un vaccin divalent permettant  
25 d'immuniser des poulets contre le virus IBDV et le virus de Marek, le polypeptide X pourra être constitué par l'une quelconque des protéines pp38, glycoprotéine B, Meq, ICP4 ou ICP 27 du virus de Marek, ou par un fragment immunogène de l'une de ces protéines, par exemple le fragment codé par le  
30 segment d'ADN situé entre les sites Eco47III-BamHI (nucléotides 1515-1800) du gène de la glycoprotéine B.

- pour obtenir un vaccin divalent permettant d'immuniser des poulets contre le virus IBDV et le virus de la Bronchite Infectieuse, le polypeptide X pourra être  
35 constituée par l'une quelconque des protéines S ou N du virus de la Bronchite Infectieuse, ou par un fragment immunogène de l'une de ces protéines, par exemple le fragment S1 de la protéine S ;

- pour obtenir un vaccin divalent permettant d'immuniser des poulets contre le virus IBDV et le virus de Newcastle, le polypeptide X pourra être constituée par l'une quelconque des protéines HN ou F du virus de Newcastle, ou  
5 par un fragment immunogène de l'une de celles-ci.

Si ces particules pseudovirales sont destinées à être utilisées comme vecteurs d'une protéine active sur des fonctions cellulaires, par exemple une cytokine ou toute autre protéine modulant la réponse immunitaire, le  
10 polypeptide X pourra être constitué par ladite protéine active.

Si ces particules pseudovirales sont destinées à être utilisées comme vecteurs d'acide nucléique, le polypeptide X pourra être constituée par un polypeptide  
15 comprenant un domaine peptidique de liaison à un acide nucléique, capable de reconnaître spécifiquement une séquence d'ADN ou d'ARN, permettant ainsi la fixation à une protéine chimérique conforme à l'invention d'une séquence d'acide nucléique comprenant ladite séquence, et son encapsidation  
20 dans une particule pseudovirale résultant de l'assemblage de protéines chimériques conformes à l'invention.

A titre d'exemples de polypeptides comprenant un domaine peptidique de liaison à un acide nucléique, et pouvant faire partie d'une protéine chimérique conforme à  
25 l'invention on citera notamment :

- des protéines d'origine virale ou des fragments de celles-ci comprenant des séquences d'encapsidation. A titre d'exemples non-limitatifs de protéines d'origine virale comprenant un domaine  
30 de liaison à l'ARN, on peut citer la protéine de capsid du phage MS2, la protéine N du virus de la rage, la protéine NCp7 des lentivirus, la protéine NSP3 des rotavirus. A titre d'exemples non-limitatifs de protéines d'origine virale comprenant  
35 un domaine de liaison à l'ADN, on peut citer les protéines intervenant dans l'encapsidation d'un génome viral, telles que la protéine ICP 8 du virus

*Herpes simplex*, la protéine gpNul du phage lambda, ou la protéine de liaison à l'ADN des adénovirus.

- des facteurs de régulation en trans de la transcription, ou des fragments de ceux-ci comprenant un domaine de liaison à l'ADN. On citera par exemple le trans-activateur du promoteur du gène *lacI* ou des doigts à zinc naturels ou artificiels [WU et al., Proceedings National Academy Science USA, 92, 344-8, (1995)].

La fixation d'une séquence d'acide nucléique à une protéine chimérique conforme à l'invention comprenant un domaine peptidique de liaison à un acide nucléique peut s'effectuer :

- dans le cas d'une séquence d'ARN, par co-expression dans une même cellule-hôte, d'une séquence d'ADN codant ladite protéine chimérique, et d'une séquence d'ADN pouvant être transcrite en un ARN comprenant une séquence cible reconnue par le domaine peptidique de liaison à un acide nucléique de ladite protéine chimérique ; ou

- dans le cas d'une séquence d'ADN, par transfection avec ladite séquence, des cellules où sont assemblées les particules pseudovirales, ou par assemblage *in vitro* des protéines des particules pseudovirales.

La présente invention englobe également des protéines chimériques, telles que définies ci-dessus, et dans lesquelles la séquence de la polyprotéine de birnavirus a été modifiée, au niveau de la séquence comprise, entre les acides aminés 1 à 512 de la protéine pVP2, pour introduire au moins un motif peptidique constituant un ligand pour un récepteur cellulaire.

Cette modification permet de moduler le ciblage des particules pseudovirales conformes à l'invention, en en modifiant la spécificité, et/ou en élargissant l'éventail des cellules-cibles.

Habituellement, les birnavirus IBDV et IPNV se lient à leurs cellules cibles, respectivement les lymphocytes

B de la bourse de Fabricius ou leurs précurseurs cellulaires, et les cellules pancréatiques ou les cellules des muscles striés par l'intermédiaire de la protéine VP2.

Pour cibler d'autres cellules, on peut introduire  
5 par exemple :

- Le motif Arg-Gly-Asp, qui est un ligand des intégrines présentes à la surface de nombreuses cellules.

- Un domaine immunoglobuline d'une molécule d'adhésion ; de tels domaines sont des ligands de différentes  
10 protéines présentées à la surface de différents types de cellules. Le choix du domaine immunoglobuline dépendra du type de cellule que l'on souhaite cibler.

Les particules pseudovirales conformes à l'invention peuvent être constituées de protéines chimériques  
15 conformes à l'invention, identiques entre elles. Elles peuvent également être constituées de sous-unités différant entre elles par la nature de le polypeptide X et/ou par la présence, dans la polyprotéine, de motifs peptidiques ciblant des cellules différentes.

20 La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention de particules pseudovirales conformes à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'une cellule-hôte exprimant une séquence d'acide nucléique codant une protéine chimérique conforme à  
25 l'invention, et la récupération des particules pseudovirales à partir de la culture.

Des séquences d'acide nucléique, les cassettes d'expression, et les vecteurs recombinants permettant la production des protéines chimériques conformes à l'invention  
30 peuvent être obtenus par les techniques classiques du génie génétique, telles que celles décrites par SAMBROOK et al., [MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989)]. Des éléments de contrôle de la transcription et de la  
35 traduction, ainsi que les vecteurs utilisables pour la construction de cassettes d'expression et de vecteurs recombinants conformes à l'invention seront choisis notamment en fonction de la cellule-hôte que l'on souhaite utiliser.



Des cellules-hôtes utilisables pour l'expression de protéines chimériques et la production de particules pseudovirales conformes à l'invention, sont en particulier des cellules eucaryotes, et notamment des cellules d'insectes, par exemple des cellules de *Spodoptera frugiperda*.

Des vecteurs utilisables dans ces cellules d'insectes sont notamment des vecteurs dérivés de baculovirus. Des méthodes de clonage et d'expression de protéines recombinantes dans un système baculovirus/cellules d'insectes, et des vecteurs utilisables pour la mise en œuvre de ces méthodes sont connus de l'homme de l'art, et sont décrits par exemple dans BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS : A LABORATORY MANUAL Freeman and Cie, New York, (1992). D'autres méthodes et d'autres vecteurs également utilisables sont décrits par exemple dans la Demande EP 0 345 152, dans la Demande EP 0 651 815, dans la Demande EP 0 638 647, ou dans la Demande PCT WO 95/20672.

Des particules pseudovirales conformes à l'invention peuvent être utilisées pour la préparation de vaccins, notamment de vaccins permettant l'immunisation de poulets contre la bursite infectieuse. Elles peuvent également être utilisées pour administrer et véhiculer *in vivo* des molécules d'intérêt thérapeutique, notamment des protéines ou des acides nucléiques, en les mettant à l'abri de la dégradation dans les fluides biologiques, et de les cibler sur les cellules souhaitées.

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation et d'utilisation de particules pseudovirales conformes à l'invention. Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

**EXEMPLE 1 : CONSTRUCTION DE BACULOVIRUS RECOMBINANTS  
EXPRIMANT LA POLYPROTEINE DU BIRNAVIRUS IBDV**

Trois baculovirus recombinants ont été construits : l'un exprime la polyprotéine pVP2-VP4-VP3 codée par le segment génomique A du virus IBDV, le second exprime la même polyprotéine fusionnée en COOH avec la protéine eGFP (Green Fluorescent protein), et le troisième exprime la même polyprotéine fusionnée en COOH avec la protéine OVA (ovalbumine).

10 **Construction des vecteurs de transfert**

**Obtention du plasmide pFBAIBDA**

La totalité du segment A (3261 paires de bases) du virus IBDV (souche CT, numéro d'accès GENBANK EMBL AJ310185) a été clonée dans le plasmide pUC19 au site EcoRI pour donner le plasmide pUC19-IBDA.

L'insert EcoRI-EcoRI du plasmide pUC19-IBDA contenant le segment A a été sous-cloné dans le plasmide de transfert pFASTBAC™ (GIBCO-BRL), en plaçant la séquence codant pour la polyprotéine sous contrôle du promoteur polyhédrine de baculovirus porté par pFASTBAC™, pour obtenir le plasmide pFBIBDA.

Une délétion de 114 bases, entre les nucléotides 6 à 120 situés dans la séquence 5' non codante du segment A, a été réalisée par coupure par PvuI et auto-ligation de pFBIBDA. Le plasmide obtenu est dénommé pFBAIBDA.

**Obtention du plasmide pFBAIBDA-GFP**

Un site de restriction unique NheI a été introduit par mutagénèse dirigée dans le plasmide pFBAIBDA pour détruire le codon stop de la séquence codant la polyprotéine du virus IBDV. Le plasmide obtenu est dénommé pFBAIBDANheI.

La séquence codant pour la protéine EGFP-C1 a été récupérée à partir du plasmide pEGFP-C1 (CLONTECH) par coupure NheI-KpnI, puis clonée au site NheI-KpnI de pFBAIBDANheI, en phase avec la séquence codant pour la

polyprotéine du virus IBDV. Le plasmide obtenu est dénommé pFBAIBDA-GFP.

Obtention du plasmide pFBAIBDA-OVA

Un polynucléotide comprenant une séquence codant  
5 pour un polypeptide (OVA) correspondant à l'ovalbumine de poulet déletée de ses acides aminés 18 à 143 a été cloné aux sites Nhe1-Kpn1 de pFBAIBDANhe1, en phase avec la séquence codant pour la polyprotéine pVP2-VP4-VP3 du virus IBDV.

Le plasmide obtenu est dénommé pFBAIBDA-OVA.

10 pFBAIBDA, pFBAIBDA-GFP ou pFBAIBDA-OVA ont ensuite été introduits dans des cellules compétentes *E. coli* DH10Bac (GIBCO-BRL). Deux jours plus tard, les colonies contenant des Bacmides™ recombinants ont été isolées, et les Bacmides™ recombinants de haut poids moléculaire ont été  
15 isolés, en suivant les instructions du manuel d'utilisation « BAC-TO-BAC™ Baculovirus expression systems », et utilisés pour transfecter des cellules d'insectes de la lignée Sf9 de *Spodoptera frugiperda* pour produire des baculovirus recombinants.

20 Trois baculovirus recombinants ont ainsi été obtenus :

- BacΔIBDA, qui exprime la polyprotéine pVP2-VP4-VP3 de IBDV seule ;
- BacΔIBDA-GFP qui exprime la polyprotéine  
25 pVP2-VP4-VP3 de IBDV fusionnée en COOH avec la protéine eGFP ;
- BacΔIBDA-OVA qui exprime la polyprotéine pVP2-VP4-VP3 de IBDV fusionnée en COOH avec la protéine OVA.

Ces baculovirus recombinants sont amplifiés par  
30 passages successifs en cellules Sf9 pour générer des stocks viraux d'environ 10<sup>8</sup> UFP (unités formant plaque)/ml.

**EXEMPLE 2 : PRODUCTION ET PURIFICATION DE PARTICULES PSEUDOVIRALES DE BIRNAVIRUS**

Des cellules Sf9 sont infectées, à une  
35 multiplicité d'infection de 3 à 10 UFP par cellule, par le baculovirus recombinant BacΔIBDA, par le baculovirus recombinant BacΔIBDA-GFP ou par le baculovirus recombinant

Bac $\Delta$ IBDA-OVA. Après 1 h d'incubation à 27°C pour permettre l'adsorption des virus, l'inoculum est retiré et remplacé par du milieu contenant 1% de sérum de veau fœtal.

**Expression de la GFP dans les cellules infectées par**

5 **Bac $\Delta$ IBDA-GFP**

Deux jours post-infection les cellules infectées par Bac $\Delta$ IBDA-GFP sont analysées par FACSCAN et par fluorescence directe, selon les protocoles suivants :

2 x 10<sup>6</sup> cellules Sf9 infectées sont reprises dans  
10 500 microlitres de tampon phosphate (PBS) pour centrifugation à 500 x g pendant 10 min. Les cellules sont reprises en paraformaldéhyde 2,5% (300 microlitres) et incubées 20 min. à température ambiante. Après deux rinçages en PBS, les cellules sont resuspendues dans 500 microlitres de PBS et  
15 analysées par FACS sur FACScan (BECTON DICKINSON).

Résultats :

On observe que l'ensemble des cellules fluorescent, ce qui permet de vérifier l'expression de la GFP dans les cellules Sf9 infectées par Bac $\Delta$ IBDA-GFP.

20 **Analyse des lysats cellulaires par immunoprécipitation :**

Deux jours post-infection, les cellules ensemencées à 3 x 10<sup>6</sup> par puits sont reprises dans 1 ml de tampon de lyse (Tris 50 mM, pH 8, 150 mM NaCl, 2% Triton X-100 complémenté par un cocktail anti-protéases) et le lysat  
25 clarifié par centrifugation à 13000 x g pendant 15 min. Le surnageant est repris pour analyse en immunoprécipitation.

Les immunoprécipitations sont effectuées selon les protocoles suivants :

500 microlitres de lysat sont mis à agiter  
30 doucement en présence de 2 microlitres de liquide d'ascites d'anticorps anti-VP2/pVP2 ou anti-VP3 ou anti-VP4 et billes de protéine A Sepharose (PHARMACIA) pendant 2 heures à température ambiante. Les billes sont ensuite lavées 3 fois par ajout d'1 ml de tampon de lyse et centrifugation pour  
35 ôter le surnageant des billes. Les billes sont ensuite reprises dans 35 microlitres de tampon de charge dénaturant et réducteur pour solubiliser les antigènes et les anticorps

complexés aux billes par ébullition pendant 3 min. Après une courte centrifugation, le surnageant des billes est repris et déposé sur gel SDS-PAGE.

Résultats :

5            Pour Bac $\Delta$ IBDA l'analyse par immunoprécipitation avec des anticorps monoclonaux révèle que l'expression de la polyprotéine génère les produits de clivage pVP2, VP3 et VP4. Il n'est pas observé de clivage de maturation de pVP2 en VP2.

10           Pour Bac $\Delta$ IBDA-GFP, l'analyse révèle les produits de clivage pVP2, VP3-GFP et VP4. On observe également le clivage de maturation de pVP2 en VP2. Environ 80% de la pVP2 est convertie en VP2.

15           Pour Bac $\Delta$ IBDA-OVA, l'analyse révèle les produits de clivage pVP2, VP3-OVA et VP4. On observe également le clivage de maturation de pVP2 en VP2. Environ 80% de la pVP2 est convertie en VP2.

Purification des particules pseudovirales :

Le lysat cellulaire est traité selon le protocole suivant :

20           Quatre jours post-infection, 6 boîtes F150 ensemencées chacune avec  $35 \times 10^6$  cellules Sf9 infectées à une multiplicité d'infection de 10 sont congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$  avec leurs surnageants de culture. Après décongélation, l'ensemble est clarifié à 5000 rpm pendant 10 min. à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le  
25           surnageant est repris pour ultracentrifugation à 40000 rpm en 45Ti (BECKMAN) pendant 1 heure. Le culot est repris en Tris 10 mM, pH 8, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA avec un cocktail d'antiprotéases. Des extractions successives au Fréon à  
30           l'aide d'un broyeur POLYTRON sont réalisées jusqu'à ce que le surnageant soit limpide. Du chlorure de césium est ajouté au surnageant pour obtenir un indice de réfraction  $\eta = 1,362$ , soit une densité de 1,30. Les gradients de chlorure de césium sont établis par centrifugation isopycnique à 35000 rpm en SW55 (BECKMAN) à  $4^{\circ}\text{C}$ .

35           La concentration en protéines dans les bandes isolées à partir du gradient est mesurée par la méthode de BRADFORD, avec comme référence la sérum albumine bovine.

L'analyse du contenu protéique de chaque bande est effectuée par SDS-10% PAGE en présence de 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol suivie de coloration au Bleu de Coomassie, et par transfert immunoélectrophorétique sur membrane IMMOBILON à 50V pendant 1 heure. Après rinçage et saturation de la membrane, des dilutions d'anticorps monoclonaux anti-pVP2/VP2, anti-VP3, anti-VP4 et anti-GFP sont utilisés pour révéler spécifiquement les antigènes. La révélation de la fixation des anticorps est réalisée avec le système ECL (AMERSHAM).

#### Résultats :

##### Cellules infectées par Bac $\Delta$ IBDA

Dans le cas des cellules infectées par le baculovirus recombinant Bac $\Delta$ IBDA, on observe une bande majeure, correspondant à une densité de 1,3. Son observation en microscopie électronique révèle la présence d'un grand nombre de tubules d'environ 60 nm de diamètre ainsi que quelques particules pseudovirales et quelques tubules d'environ 25 nm de diamètre.

L'analyse par SDS-PAGE révèle une bande de 48 kDa très majoritaire. L'analyse par transfert immunoélectrophorétique montre que la bande de 48 kDa correspond à la protéine pVP2.

Il apparaît donc que l'expression de la polyprotéine sauvage d'IBDV en système baculovirus n'aboutit pas à la production efficace de particules pseudovirales, mais résulte en l'assemblage de pVP2 en tubules.

##### Cellules infectées par Bac $\Delta$ IBDA-GFP

Dans le cas des cellules infectées par Bac $\Delta$ IBDA-GFP, une bande majeure a été identifiée, à une densité de 1,3. Son observation en microscopie électronique montre qu'elle contient une très grande proportion de particules, d'environ 60 nm de diamètre, de structure icosaédrique et de morphologie identique à celle des virions IBDV de type sauvage. L'observation par microscopie optique montre que ces particules sont fluorescentes.

L'analyse par SDS-PAGE et coloration par Bleu de Coomassie révèle des bandes de 60 kDa, 48 kDa et 38 kDa.

L'analyse par transfert immunoélectrophorétique montre que ces bandes correspondent respectivement aux protéines VP3-GFP, pVP2 et VP2 mature.

Cellules infectées par BacΔIBDA-OVA

5            Dans le cas des cellules infectées par BacΔIBDA-OVA, une bande majeure a été identifiée à une densité de 1,3. Son observation en microscopie électronique montre qu'elle contient une très grande proportion de particules, d'environ 60 nm de diamètre, de structure icosaédrique et de  
10 morphologie identique à celle des virions IBV de type sauvage.

            L'analyse par SDS-PAGE et coloration par Bleu de Coomassie révèle des bandes de 58 kDa, 48 kDa et 38 kDa. L'analyse par transfert immunoélectrophorétique montre que  
15 ces bandes correspondent respectivement aux protéines VP3-OVA, pVP2 et VP2.

            Ces résultats montrent que l'addition d'une séquence polypeptidique exogène à l'extrémité COOH de la polyprotéine permet l'assemblage des protéines pVP2 et VP3 en  
20 particules pseudovirales, et la maturation finale de pVP2 en VP2.

## REVENDICATIONS

- 1) Protéine chimérique comprenant la polyprotéine d'un birnavirus, liée à son extrémité C-terminale à un polypeptide X.
- 5 2) Protéine chimérique selon la revendication 1, caractérisée en ce que la taille du polypeptide X est comprise entre 5 et 2000 acides aminés, de préférence entre 10 et 500 acides aminés.
- 3) Protéine chimérique selon une quelconque des  
10 revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit birnavirus est le virus IBDV.
- 4) Particule pseudovirale de birnavirus caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une protéine chimérique selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 15 5) Séquence d'acide nucléique codant une protéine chimérique selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 6) Cassette d'expression comprenant une séquence d'acide nucléique selon la revendication 5, associée à des éléments appropriés de contrôle de la transcription.
- 20 7) Vecteur recombinant comprenant au moins une séquence d'acide nucléique selon la revendication 5.
- 8) Cellule-hôte transformée par au moins une séquence d'acide nucléique selon la revendication 5.
- 9) Cellule hôte selon la revendication 8,  
25 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule d'insecte.
- 10) Procédé d'obtention de particules pseudovirales selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'une cellule-hôte selon une quelconque des revendications 8 ou 9, et la récupération  
30 des particules pseudovirales à partir de la culture.
- 11) Utilisation de particules pseudovirales selon la revendication 4, pour l'obtention d'un médicament.
- 12) Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit médicament est un vaccin.
- 35 13) Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que ledit vaccin est destiné à l'immunisation de poulets contre la bursite infectieuse.



14) Utilisation selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit médicament est un vecteur permettant de transporter une molécule d'intérêt thérapeutique vers une cellule-cible.